FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

7

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ISOANTICORPS MYOCARDIQUES

(Etude expérimentale chez le rat)

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

Le JUIN 1955

PAR

ROGER ROUL

Né le 22 Décembre 1924, à MARSEILLE (B.-du-Rh.)

Licencié ès Sciences

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. J. BRAHIC, Président ; J. DELPHAUT, Y. POURSINES, Ch. GREBUS (Assesseurs)

IMPRIMERIE MODERNE
GARDANNE
1955

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ISOANTICORPS MYOCARDIQUES

(Etude expérimentale chez le rat)

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ISOANTICORPS MYOCARDIQUES

(Etude expérimentale chez le rat)

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

Le JUIN 1955

PAR

ROGER ROUL

Né le 22 Décembre 1924, à MARSEILLE (B.-du-Rh.)

Licencié ès Sciences

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. J. BRAHIC, Président ; J. DELPHAUT, Y. POURSINES, Ch. GREBUS — Assesseurs

IMPRIMERIE MODERNE
GARDANNE
1955

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN — **Assesseur** : J. DELPHAUT

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER.

Chargé de cours honoraire : M. TIAN

Secrétaire Principal : J. COMTE — **Bibliothécaire** : Mlle PERRIN

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD*
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique Dermato-syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Clinique Urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	CARCASSONNE
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX

Maitres de Conférences Agrégés

MM. BOURRET	MM. MERCIER Jacques
DONNET	MOURGUE
GREBUS	LISSITSKY

Agrégés en exercice

MM. APPAIX	MM. MARONNEAUD
BERNARD	MONGES H.
CREMIEUX	OLLIVIER
GRANJON	OURGAUD
HENRY	PAOLI
LAMY	RAYBAUD
LAVAL	SERMENT
LENA	VAGUE

Agrégés libres

MM. BERTHIER	MM. FIGARELLA
DOR	IMBERT

Chargés des fonctions de Maitres de Conférences

Anatomie Pathologique	M. PAYAN
Botanique et Cryptogamie	M. BERNARD P.
Histologie	M. STAHL

Chargé des fonctions d'Agrégé

Clinique Urologique	M. CHAUVIN

A MA MERE,

A MON PERE,

A TOUS LES MIENS,

A Monsieur le Professeur J. BRAHIC,

Qui a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse. Hommage respectueux et reconnaissant.

A Monsieur le Professeur J. DELPHAUT,

Chevalier de la Légion d'Honneur

Assesseur de Monsieur le Doyen,

Qui me fait l'honneur de juger ce travail. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre enseignement et de goûter votre cordialité et votre affabilité.

Soyez assuré de ma profonde et respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Y. POURSINES,

C'est grâce à vous que l'histopathologie de ce travail a pu être réalisée.

Pour cela et pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, je vous exprime ici ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A MON MAITRE,

Monsieur le Professeur Ch. GREBUS,

Vous avez bien voulu m'accepter dans votre laboratoire de microbiologie et me considérer comme l'un de vos élèves.

J'ai toujours trouvé auprès de vous affectueuse sympathie et conseils éclairés.

Vous qui donnez si bien l'exemple du dévouement et du désintéressement, vous savez stimuler par votre autorité mais aussi encourager par vos conseils précieux.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A MON AMI, le Docteur Pierre BERNARD,

Dans ce travail, nous avons uni nos deux volontés et nos connaissances. Accepte mes remerciements pour la confiance et l'amitié que tu m'as témoignées.

INTRODUCTION

La notion de maladie par iso ou auto-agression est un problème d'actualité dans le domaine de l'immuno-pathologie. N. FIESSINGER fut le premier à soupçonner dans l'évolution de la cirrhose hépatique l'intervention d'un processus d'auto-agression faisant suite à la lésion créée par l'intoxication alcoolique.

Il s'exprimait ainsi : ...« à l'hétero-intoxication alcoolique succède l'auto-intoxication, si bien que le malade ne défend plus son foie, il se défend contre son foie ».

Depuis lors, cette notion d'auto-anticorps, producteurs de maladies dites « auto-entretenues » s'est introduite dans les différents secteurs de la pathologie et tente d'expliquer l'étiologie de nombreuses affections.

Nous citerons pour mémoire les néphropathies, les anémies hémolytiques, les leuco-encéphalomyélites démyélinisantes, le rhumatisme articulaire aigu (maladie de Bouillaud) et la cardite rhumatismale.

La découverte des auto et iso-anticorps n'est cependant pas nouvelle et les immunologistes s'y sont intéressés dès le début du siècle ; toutefois, l'intervention probable de ces processus en pathologie a fixé l'intérêt des chercheurs et des cliniciens sur ce problème.

La connaissance de plus en plus parfaite de la notion d'antigènes, d'anticorps et d'haptènes, l'aide précieuse de la biochimie dans ce domaine permettent, dans certains cas, d'en préciser le mécanisme.

La grande loi de l'hétérogénéité des anticorps est fondamentale en immunologie. Pour qu'une substance soit antigénique, il est indispensable qu'elle soit étrangère à l'organisme humain ou animal dans l'intimité duquel elle pénètre.

S'il n'en était pas ainsi, la vie serait physiologiquement impossible car les cellules, les tissus et les organes deviendraient inaptes à accomplir leur rôle.

Il y a cependant de rares exceptions qui peuvent paraître, *a priori,* paradoxales. Nous rappellerons à ce sujet les expériences de MÉTALNIKOF sur les sérums auto-spermotoxiques.

Les animaux élaborent des auto-anticorps lorsqu'on leur injecte, par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale, leurs propres spermatozoïdes. C'est là évidemment un exemple parfait qui paraît infirmer la loi de l'hétérogénéité. Cependant, écrit BORDET : ... « les spermatozoïdes se distinguent si profondément des autres éléments de l'organisme et sont à l'état normal, si étroitement parqués, que leur présence dans le tissu cellulaire sous-cutané, les cavités séreuses ou le sang, étant contraire à la discipline organique, éveille l'activité des cellules phagocytaires comme le feraient des particules venues du dehors. C'est pour la même raison que la sécrétion d'anticorps peut s'établir ».

Il est incontestable que des cellules qui, habituellement, ne sont pas en contact intime avec les humeurs, peuvent se comporter comme si elles étaient étrangères à cet organisme.

Pour qu'une cellule, un tissu ou un organe deviennent antigéniques, il faut que leur présence soit inhabituelle — (se comportent alors comme des éléments étrangers) — ou que leur constitution chimique soit à ce point perturbée qu'elle se montre hétérogène.

La lésion, la transformation de structure peut être profonde et occasionnée par une substance toxique ou sous la dépendance d'un processus infectieux microbien ou viral.

Il peut s'agir aussi d'une transformation de « surface » par adsorption d'antigène qui vient recouvrir l'élément cellulaire et donc le modifier.

L'idée directrice de notre travail nous a été fournie par les travaux de CAVELTI sur les auto-anticorps myocardiques chez le rat.

Nous avons essayé de reproduire chez cet animal les lésions constatées par cet auteur et mettre en évidence les modifications sérologiques et anatomo-pathologiques.

Nous rappellerons dans une première partie le détail de son expérimentation.

Dans un deuxième chapitre, nous rapporterons notre expérimentation personnelle réalisée en collaboration avec le Docteur BERNARD et qui a fait le sujet de sa thèse de Doctorat en Médecine.

Nous montrerons les modifications sérologiques et humorales observées.

Le troisième chapitre traitera du problème de la localisation des anticorps. Après avoir rappelé les expériences de PRESSMAN et SHERMAN, nous décrirons l'étude expérimentale qui nous a permis de déceler la fixation et l'élimination des anticorps anticœur à l'aide des globulines marquées par l'I131.

Cet important chapitre a pu être réalisé grâce à l'étroite collaboration de la chaire de Physique de la Faculté de Pharmacie de MONTPELLIER, dirigée par M. le Doyen CANALS et M. le Professeur Agrégé MARIGNAN, avec l'assistance de M^lle^ CORDIER que nous tenons à remercier, ici, très respectueusement.

L'étude histologique des lésions provoquées par l'isoagression viendra prouver enfin la réalité des modifications observées. Elle a pu être effectuée grâce à la compétence de M. le Professeur POURSINES.

Pour ses précieux conseils, nous tenons à lui adresser l'hommage de notre profonde gratitude.

CHAPITRE PREMIER

TRAVAUX DE CALVETI ET SES COLLABORATEURS

Production expérimentale d'auto-anticorps pour le cœur, le muscle et le tissu conjonctif.

En 1934, BURKY montra que des lapins inoculés avec des filtrats de toxine staphylococcique provenant de cultures en bouillons préparés à partir de broyats de lentilles furent sensibilisés à ces broyats, comme le mirent en évidence des tests cutanés.

Il lui fut également possible d'obtenir une auto-sensibilisation à l'extrait de muscle de lapin, en utilisant comme antigène. une toxine obtenue par culture de microbes sur un milieu contenant du muscle de lapin.

Par conséquent, la toxine staphylococcique semble posséder la propriété de conférer le pouvoir antigénique à certains tissus animaux avec formation consécutive d'iso-anticorps vis-à-vis de ces tissus chez des animaux de même espèce.

Se servant de reins de lapin mis en contact avec la toxine staphylococcique, SCHWENTKER et COMPLOIER obtinrent des anticorps fixateurs du complément en présence de rein de lapin. Ils constatèrent par ailleurs que la toxine streptococcique ne conférait que faiblement le pouvoir antigénique au rein de cette espèce animale.

Des précipitines pour des extraits de peau de lapin furent produites par HECHT et WEAL chez ces animaux, en les immunisant à l'aide d'un mélange d'émulsion de peau de lapin et de toxine staphylococcique.

Dans des travaux personnels, CAVELTI a montré que des auto-anticorps antirein peuvent être obtenus chez le lapin et chez le rat en leur injectant du tissu rénal combiné à des substances streptococciques, en particulier les substances provenant de streptocoques du groupe A, β hémolytiques tués.

Ces auto-anticorps furent mis en évidence *in vitro* (souvent à un degré élevé chez le lapin) à l'aide de la technique des particules de collodion. En outre, chez certains rats, il put observer des glomérulo-néphrites aiguës et chroniques comme conséquence d'une réaction *in vivo* entre l'antigène et l'auto-anticorps.

Dans ses expériences, CAVELTI a cherché à savoir si les streptocoques sont capables, d'une manière analogue, de former des substances douées de pouvoir antigénique en s'unissant avec d'autres tissus, provoquant ainsi à leur égard la formation d'auto-anticorps tissulaires.

Il a également essayé de démontrer que les auto-anticorps ainsi formés sont capables de léser les tissus correspondants à la suite d'une réaction *in situ* avec l'antigène.

MATERIEL ET METHODES

1. Préparation du matériel tissulaire.

Pour la plupart des expériences faites sur les rats, CAVELTI s'est servi de tissus lavés au préalable, en perfusant l'animal avec du sérum physiologique stérile.

Chez le rat anesthésié à l'éther, une canule est introduite dans le ventricule gauche, immédiatement après thoracotomie et avec une branche de ciseaux, l'oreillette droite est ouverte. Deux minutes suffisent généralement pour la perfusion cardiaque, mais si l'on veut utiliser d'autres tissus, la perfusion doit être poursuivie environ 5 à 10 minutes.

Cœur et rein sont manipulés aseptiquement, tous les tissus sont conservés au froid soit dans un réfrigérateur à —18°, soit dans un récipient type Dewar contenant de l'anhydride carbonique à —76°, jusqu'à usage. Dans ce dernier cas, CAVELTI se

sert de récipients hermétiquement bouchés, pour éviter que des vapeurs d'anhydride carbonique ne viennent en contact avec le matériel.

Les tissus sont broyés jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, puis mélangés à une culture de streptocoques du groupe A β hémolytiques cultivés sur un milieu synthétique sans protéine. C'est le mélange de tissus broyés et de streptocoques qui constitue l'antigène.

CAVELTI a également purifié son complexe antigénique en utilisant non plus les corps microbiens, mais des protéines streptococciques.

Chez les rats, en règle générale, il pratique une série de dix injections intra-péritonéales, à raison de une par jour. Pour la plupart des animaux, une seconde et souvent une troisième série analogue fut utilisée à des intervalles variant de un à deux mois entre chaque série. Il a effectué enfin, mais plus rarement, six séries d'injections.

L'immunisation des rats, mâles en majorité, est pratiquée chez des sujets jeunes de 2 mois et demi à 4 mois environ.

L'étude sérologique qui a permis à cet auteur de suivre l'immunisation et son intensité a été réalisée par la technique de floculation des particules de collodion.

RESULTATS SEROLOGIQUES

Les expériences ont porté sur un nombre considérable d'animaux. Il s'agissait de vérifier la formation d'anticorps susceptibles de réagir avec le composant tissulaire du complexe antigénique utilisé.

Pour les tests *in vitro,* CAVELTI a uniquement utilisé des extraits de tissus normaux, c'est-à-dire non mélangés aux streptocoques ou à leurs constituants protéiques. Les résultats obtenus avec des mélanges de sérums furent notablement inférieurs à ceux obtenus avec des sérums individuels.

Dans la mesure du possible, les tests sérologiques furent pratiqués 24 heures au plus tard après la récolte des sérums, car les anticorps deviennent instables lorsque les sérums sont mis en réserve.

Des réactions non spécifiques furent observées par CAVELTI surtout avec les extraits de tissu conjonctif de la carcasse de rat, ou avec des extraits de muscle du même animal. Les résultats les plus constants furent obtenus avec de l'extrait de cœur de rat utilisé comme antigène. Cependant, des pseudo-réactions positives se produisirent occasionnellement avec des dilutions de sérums allant jusqu'au 1/20e. C'est pourquoi pour tous les tests, seules les réactions avec des dilutions excédant le 1/20e furent considérées comme positives.

Les résultats des travaux de CAVELTI montrent la formation d'anticorps pour une proportion considérable d'animaux traités avec des émulsions tissulaires de rats additionnées de streptocoques tués. Ces anticorps étaient en effet capables de réagir *in vitro* avec des extraits du composant tissulaire homologue isolé.

Les sérums de rats, traités uniquement avec l'émulsion tissulaire ou avec les streptocoques tués seuls, ne permirent pas de mettre en évidence de tels anticorps.

Production d'anticorps anti-cœur chez le lapin.

CAVELTI a immunisé des lapins avec des mélanges de streptocoques tués et de broyat de cœur de lapin préalablement perfusé. Les composants étaient mêlés dans les proportions suivantes : deux parties d'une émulsion de cœur à 20 % pour une partie d'une suspension de streptocoques tués à l'éther.

Cet auteur put mettre en évidence, chez la moitié des animaux, des réactions positives, traduisant une production d'anticorps réagissant *in vitro* avec des extraits de cœur de lapin.

CAVELTI, cependant, a obtenu les résultats les plus probants par le critère sérologique en préparant des rats à l'aide d'injections de streptocoques tués (corps microbiens intacts) et d'extraits de cœur de rat.

Résumons d'ailleurs, pour plus de clarté, les travaux de CAVELTI dans le tableau suivant fourni par l'auteur.

TABLEAU

ANTIGENES INJECTES	RESULTATS SEROLOGIQUES	MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES
	1° - LAPIN	
Rein de lapin + streptocoques	anticorps anti-rein	rarement glomérulonéphrite
Rein de lapin	pas d'anticorps	pas de lésions
Cœur de lapin + streptocoques	anticorps anti-cœur	pas de lésions définies
Cœur de lapin	pas d'anticorps	pas de lésions
Streptocoques	anticorps antistreptocoques	pas de lésions
	2° - RAT	
Rein de rat + streptocoques	anticorps anti-rein	glomérulonéphrite
Rein de rat	pas d'anticorps	pas de lésions
Cœur de rat + streptocoques	anticorps anti-cœur	lésions cardiaques : endocardite myocardite
Cœur de rat	pas d'anticorps	pas de lésions
Tissu conjonctif + streptocoques	anticorps anti-conjonctif	lésions cardiaques : endocardite myocardite
Muscles somatiques + streptocoques	anticorps anti-muscles	pas de lésions
Foie de rat + streptocoques		pas de lésions
Streptocoques	anticorps antistreptocoque seuls	pas de lésions cardiaques ou rénales

Si nous voulons schématiser les résultats, nous pouvons dire :

1° Streptocoques (antigène) anticorps antistreptocoques

2° Tissus seuls (non antigène) pas d'anticorps

mais *Streptocoques + tissu* (agissant dans un certain sens comme un haptène) constituent un antigène à double spécificité anticorps anti-strepto et anti-tissu homologué.

Désirant ainsi nous placer dans les meilleures conditions expérimentales, nous avons repris ces travaux chez le rat en utilisant le myocarde de cette espèce.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

Nous allons exposer ici les techniques d'iso-sensibilisation et de mise en évidence d'anticorps anti-cœur chez le rat blanc.

1° Méthode expérimentale — matériel utilisé.

a) - *Broyat de cœurs.*

Les animaux de deux à quatre mois sont anesthésiés à l'éther. Après ouverture du thorax et découverte du cœur, celui-ci est perfusé pendant deux minutes avec du sérum physiologique.

L'animal étant encore en vie, le cœur est retiré et broyé dans un mortier de porcelaine stérile avec une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir une suspension épaisse.

Cette suspension est centrifugée à faible vitesse pour éliminer les gros fragments. La suspension surnageante homogène est prélevée et incorporée aux streptocoques.

b) - *Souches de streptocoques.*

Nous avons utilisé les souches suivantes de streptocoques du groupe A (Lancefield) β hémolytiques : CN. 15 ; CN. 2 ; CN. 532 ; CN. 335 ; CN. 257. Ces souches lyophilisées nous ont été adressées par le Centre de collections microbiennes de Beckenham, elles furent conservées au réfrigérateur jusqu'au moment de l'emploi.

c) - *Cultures.*

La souche lyophilisée est ensemencée au départ en bouillon ascite et incubée pendant 8 heures à l'étuve à 37°. On centrifuge alors la culture obtenue pour éliminer le plus possible

le bouillon. Le culot de centrifugation est ensemencé dans le milieu déprotéiné de Bernheimer. Ce milieu est constitué par le mélange des six solutions suivantes :

SOLUTION I

— Eau distillée	10 litres
— SO4 Mg (7 OH2)	7,5 g.
— Uracile	150 mg.
— Sulfate d'adénine	150 mg.
— Rouge de phénol	110 mg.

Dans un ballon pyrex de 20 litres, on stérilise 20 minutes à l'autoclave à 120°.

SOLUTION II

— Hydrolysat de caséine à 10% (nous avons utilisé le produit Difco).	3 litres
— Cystine ..... (dissoute dans l'eau à l'aide d'un peu de ClH concentré)	2 g.
— ClK	45 g.
— PO4 H2 K	37,5 g.
— PO4 HNa2, 12 H2O	15 g.
— Rouge de phénol	2 cm3 de sol. à 0,4 %

pH ajusté avec de la soude 5N à 7.5 - 7.8.
Ebullition douce : 5 minutes et filtration.

Au filtrat, on ajoute :

0,015 mg. de Biotine
15 mg. d'acide nicotinique
15 mg. de pyridoxine
300 mg. de tryptophane.

Stérilisation : 20 minutes à l'autoclave à 120°.

SOLUTION III

300 cm3 de CO3 NaH à 10 %

SOLUTION IV

20 cm3 d'acide thioglycollique à 10 %

Stérilisé 10 minutes à l'autoclave.

Solution V

— Pantothénate de calcium .. 60 mg.
— Thiamine ..... 15 mg.
— Riboflavine ..... 7 mg.
— Glutamine ..... 3 g.
— Eau distillée 50 cm3
Stérilisé par tyndallisation.

Solution VI

1 litre de solution de glucose à 50 %.
+ 150 mg. Cl2 Ca
+ 30 cm3 de solution saline de formule suivante :
— 50 mg. SO4Cu 5 OH_2
— 50 mg. SO4Zn 7 OH_2
— 50 mg. SO4Fe 7 OH_2
— 20 mg. MnCl2 4 OH_2
— 1 cm3 ClH concentré
— 100 cm3 eau distillée
Stérilisé 20 minutes en autoclave.

On réalise extemporanément le mélange des diverses solutions de la façon suivante :

La solution I est chauffée à 35°, les autres sont ajoutées successivement dans l'ordre numérique. Nous avons préparé et utilisé un volume réduit au 1/100e du milieu ci-dessus.

Après l'ensemencement, il faut agiter fréquemment les cultures maintenues pendant 48 heures à l'étuve à 37° à pH7 (par addition de soude 5N).

Après 48 heures de séjour à l'étuve, on centrifuge la culture de streptocoques pour éliminer le milieu de Bernheimer.

On reprend le culot de centrifugation par quelques cm3 de sérum physiologique stérile. C'est cette suspension dense de streptocoques vivants que l'on va mélanger dans le mortier stérile au broyat de cœur.

Préparation de l'antigène définitif.

Purée microbienne et myocarde sont minutieusement broyés au mortier. Le mélange est alors déshydraté par l'acé-

tone à très basse température et par congélations et décongélations répétées, on assure le broyage des corps microbiens.

Le protocole utilisé est le suivant :

— L'acétone contenue dans un petit tube à centrifuger est placée dans un bain d'alcool à 95° et de carboglace contenu dans un vase Dewar. A l'acétone refroidie (— 50°), on incorpore le mélange streptocoques - broyat de cœur, en agitant constamment. Après congélation d'une durée d'environ demi-heure, la température est ramenée lentement à 0° par immersion dans un bain d'eau et de glace. Une centrifugation rapide permet d'éliminer l'acétone. Le culot est alors traité de la même façon que précédemment à quatre ou cinq reprises. Après une nuit au réfrigérateur, les mêmes opérations sont renouvelées le lendemain. On obtient finalement un mélange antigénique déshydraté d'aspect pulvérulent conservé au froid.

On s'assure de sa stérilité — c'est-à-dire de la destruction des corps microbiens — par ensemencement en bouillon ascite d'une petite quantité.

Protocole d'immunisation des animaux.

Une série de 10 injections intra-péritonéales en 10 jours consécutifs est pratiquée à des lots de cinq rats blancs. On les maintient ensuite au repos trois semaines à un mois et on recommence une nouvelle série de 10 injections.

Certains lots ont reçu deux séries, d'autres trois, d'autres enfin six séries.

Les doses quotidiennes étaient les suivantes : 1 ml à chaque animal, d'une suspension obtenue en mélangeant 1/10e de la quantité totale d'antigène strepto-myocardique à 5 ml. de sérum physiologique.

Prélèvement de sang.

CAVELTI ponctionne la veine caudale après avoir fait séjourner les animaux dans un bain chaud à 45° - 55°. Dans ces conditions, nous n'avons pas réussi à ponctionner d'une manière régulière la veine de la queue du rat. Nous avons essayé de l'immerger dans de l'eau à 60° pour provoquer une

vaso-dilatation. Mais la présence de traces d'eau provoquant parfois une hémolyse, nous avons modifié cette technique de la façon suivante :.

Le rat étant très légèrement anesthésié à l'éther, on sectionne l'extrémité de la queue, ce qui permet de recueillir très facilement 1 cm3 à 2 cm3 de sang. Après ligature, l'animal recevait une injection de sérum physiologique lorsqu'on en prélevait 2 cm3 ou plus, par exemple, au cours des expériences ultérieures sur les isotopes marqués.

RESULTATS

Dans toutes les expériences, les examens étaient pratiqués le plus rapidement possible après la récolte des sérums et conservés au réfrigérateur aux environs de + 4°.

Le premier but poursuivi a consisté à savoir si les animaux traités par le complexe antigénique présentaient bien des traces de leur immunisation ; autrement dit, il nous a paru nécessaire de contrôler l'efficacité des injections pour savoir si le mélange strepto-myocardique était bien un antigène.

Nous savons que l'introduction dans un organisme d'une substance étrangère provoque, d'une part, une modification qualitative des protéines sériques, et d'autre part, que l'immunserum obtenu est capable, dans certains cas, de réagir avec l'antigène spécifique pour produire une floculation.

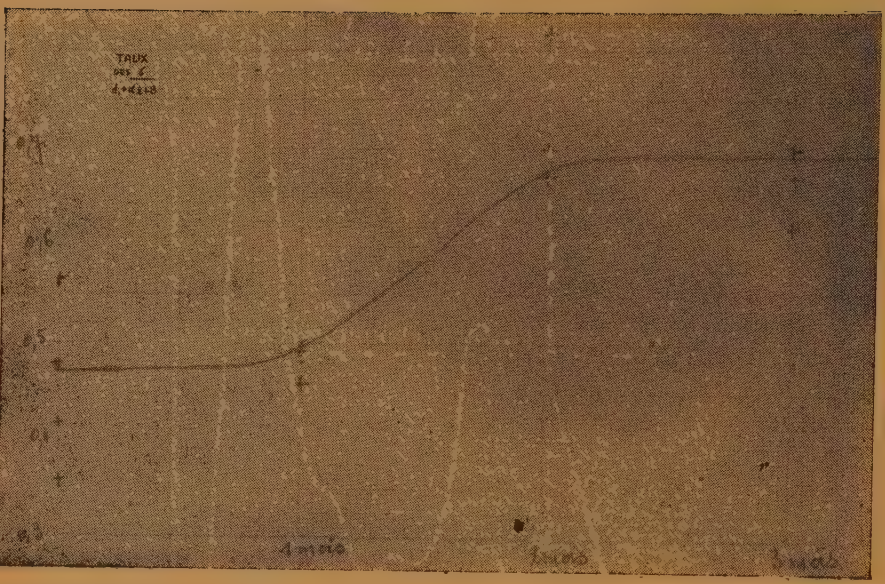
Nous avons donc étudié les modifications humorales :

1° Sur le plan protéique par la micro-électrophorèse sur papier ;

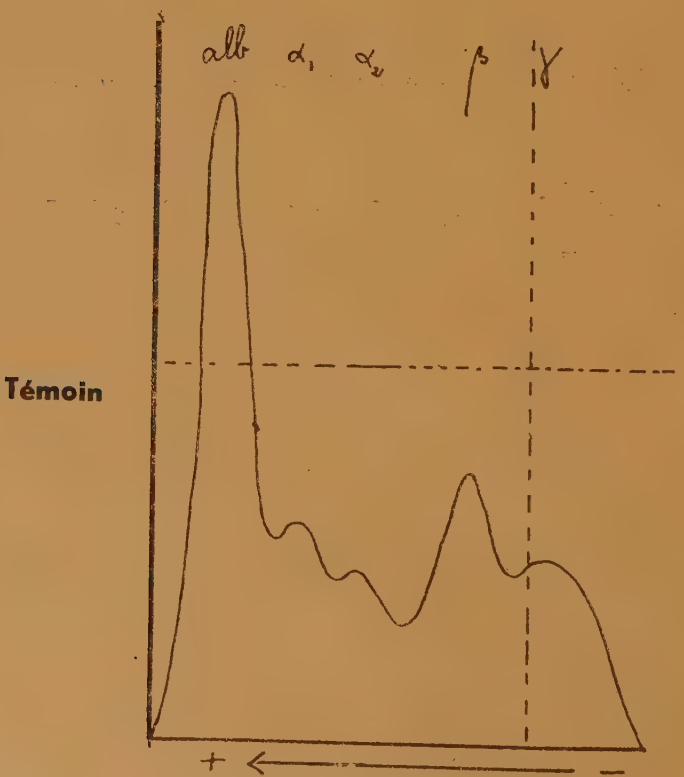
2° Sur le plan sérologique, par la méthode de floculation de suspensions de particules de collodion, telle qu'elle est rapportée par CANNON et MARSHALL.

I. ETUDE DES MODIFICATIONS DE L'EQUILIBRE PROTEIQUE PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER

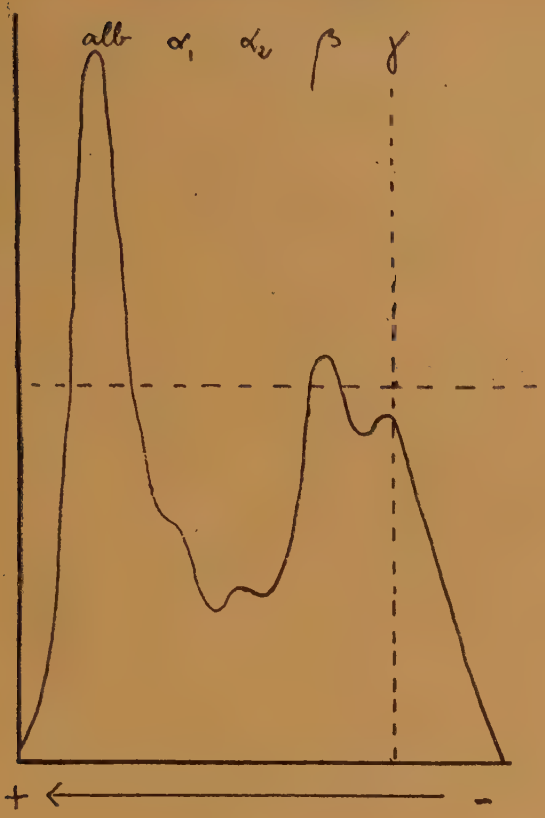
Il nous a paru intéressant de vérifier si l'apparition de tels anticorps était confirmée par une modification des différentes fractions protéiques du sérum.



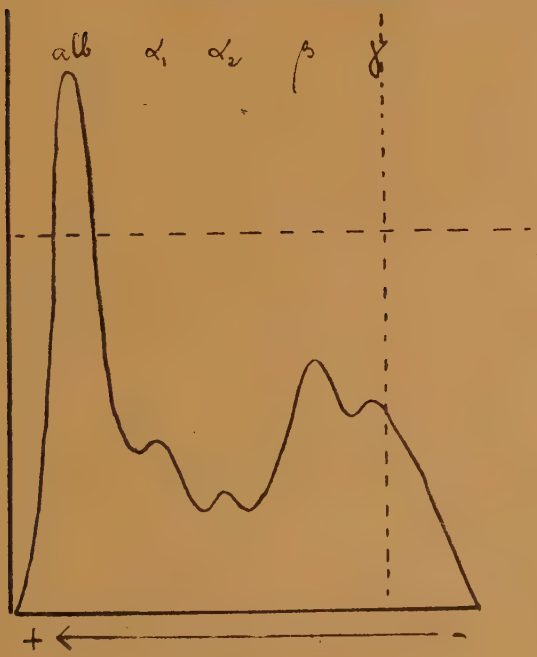
Courbe traduisant l'augmentation des globulines en fonction du temps



RATS 2me Série



RATS 3me Série



Il est classique d'affirmer que la présence d'anticorps se traduit, sur le plan humoral, par une augmentation du taux des gamma-globulines.

Nous avons effectué l'électrophorèse sur papier de pools de sérums de rats-témoins et en cours d'immunisation.

Appareillage :

Elpher H. (GRASSMANN et HANNIG).
Papier n° 2043 à Mgl.
Tampon véronal pH 8,6.
Durée de passage du courant : 12 heures.
Coloration au noir amide.
Lecture photométrique.
Tracé des courbes et détermination des pourcentages des différentes fractions par planimétrie.

Nous avons déterminé les courbes d'électrophorèse :

1° De sérums de rats-témoins ;
2° De pools de sérums de rats en cours d'immunisation (première série) ;
3° De pools de sérums de rats en cours d'immunisation (deuxième et troisième séries).

Nous avons consigné les résultats dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU

	Albumine %	GLOBULINES %				
		$\alpha 1$	$\alpha 2$	β	$\alpha 1 + \alpha 2 + \beta$	γ
Rats témoins	38	11	9,6	21,7	42,6	20
Rats en cours d'immunisation 1re série	42,2	9,1	8,5	21,3	39	18,8
Rats en cours d'immunisation (2e et 3e série)	42,5	8	8,2	17,7	34	23,7

Nota. — Les chiffres indiqués sont les moyennes de plusieurs déterminations.

Nous rapportons, d'autre part, trois courbes d'électrophorèse caractéristiques, une pour chaque série.

En comparant les divers résultats électrophorétiques, nous pouvons constater une augmentation du taux des gammaglobulines par rapport aux alpha$_1$, alpha$_2$, et beta. Cette augmentation sensible pour les deuxième et troisième séries, traduit probablement un accroissement des moyens de défense de l'organisme.

II. ETUDE DES MODIFICATIONS SEROLOGIQUES PAR LA METHODE DE FLOCULATION DES PARTICULES DE COLLODION

Préparation de l'antigène myocardique.

Nous avons appliqué la technique de CANNON et MARSHALL, modifiée par EISLER et CAVELTI.

L'antigène spécifique utilisé pour les tests est une suspension à 20 % en eau physiologique de broyats de cœurs de rats.

On pratique deux ou trois congélations successives pour purifier l'émulsion et les grosses particules sont éliminées par centrifugation. La suspension surnageante est utilisée.

Remarque. — Nous avons été amenés au cours des expériences, à diminuer le délai qui séparait la dernière injection immunisante, du prélèvement de sang. Au début, on étudiait les sérums huit jours après la dernière piqûre, ensuite pour avoir des réactions de floculation plus nettes, nous avons prélevé le sang, deux ou trois jours seulement après la dernière injection.

Nous avons pu obtenir quelquefois une floculation non spécifique des particules de collodion mélangées à l'antigène. Mais ces réactions étaient surtout évidentes pour les faibles dilutions (1/10 ou 1/20^e) ; aussi, nous ne tenions compte que des dilutions supérieures au 1/20^e.

Préparation des particules de collodion

On verse 2,50 g. de collodion pur dans environ 100 ml d'eau bidistillée en agitant ; après trois lavages successifs, on

fait sécher à l'étuve à 40°. Ce collodion lavé est mis en solution à 5 % dans l'acétone pure.

Cette solution-mère nous sert à préparer la suspension de particules de collodion selon la technique ci-dessous :

— à 50 cm3 de solution-mère, on va incorporer 20 cm3 du mélange suivant : eau bidistillée : 15, acétone : 5. Le ballon contenant la solution-mère est placé dans un bain-marie à 40°, on agite vigoureusement et, pendant cette agitation, on introduit sous forme de jet très fin (à l'aide d'une seringue et d'une aiguille), le mélange eau-acétone.

On observe la formation d'un trouble dans la liqueur surnageante par excès du mélange eau-acétone.

On peut alors soit utiliser directement cette liqueur surnageante trouble, soit redissoudre le précipité dans de l'acétone et recommencer l'opération. Il est préférable, pour obtenir des particules de collodion plus régulières, de faire redissoudre le précipité de collodion et de le traiter une seconde fois par un mélange eau-acétone.

On décante alors la liqueur surnageante trouble dans un verre à filtration contenant 200 cm3 d'eau bidistillée froide. On prélève une petite quantité de suspension de particules de collodion (20 cm3 environ) et l'on fait évaporer l'acétone à l'aide d'une troupe à vide, jusqu'à ce qu'il n'y ait absolument plus d'odeur d'acétone (durée 4 ou 5 heures environ). Pour éliminer les grosses particules, on filtre et on centrifuge à basse vitesse pendant 20 minutes. On obtient finalement un liquide blanc laiteux que l'on va utiliser pour les tests sérologiques.

Remarque. — Les floculations dépendent essentiellement de la qualité des particules de collodion. On peut observer au microscope les particules pour vérifier leur taille approximative et la régularité de leurs dimensions. Il faut que les particules de collodion soient fraîchement préparées.

Préparation du mélange antigène - collodion

On mélange extemporanément deux parties d'antigène myocardique et une partie de suspension de particules de collodion.

Cet antigène sera utilisé à la dose de 0,2 ml.

Dilutions d'anti-sérums.

Le sérum est dilué avec de l'eau physiologique pour obtenir les dilutions de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/280e.

A 0,5 ml de chaque dilution, on ajoute 0,2 ml de mélange collodion-antigène.

Lecture des tests.

Après mélange du collodion sensibilisé par l'antigène aux dilutions de l'antisérum, on agite et on laisse en contact une ou deux heures à la température du laboratoire.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant deux minutes, à très faible vitesse.

On lit les résultats à la lumière artificielle devant un écran noir en se servant d'un miroir concave. Le culot est remis en suspension par légère agitation et on apprécie l'intensité de la floculation suivant que le mélange est plus ou moins granuleux et suivant la dimension des floculats.

Pour éliminer les réactions non spécifiques, on peut diminuer la concentration de l'antigène à 5 %, au lieu de 20 %. On pratique également des réactions de contrôle en utilisant des dilutions de sérum mélangées avec des particules de collodion sans antigène, et, d'autre part, en utilisant un mélange antigène collodion + sérum physiologique (sans antisérum).

RESULTATS

Ils sont exprimés dans le tableau ci-après et montrent que même après la première série d'injections immunisantes, nous obtenions une floculation (pour des pools de sérums) jusqu'à la dilution de 1/1280e. Remarquons que des sérums témoins nous ont fourni des floculations aux dilutions de 1/40e et quelquefois des floculations difficiles à apprécier au 1/160e.

Toutefois, aucun n'a floculé le mélange antigénique à des taux supérieurs.

TABLEAU

DILUTIONS	1/40°	1/80°	1/160°	1/320°	1/640°	1/1280°
Témoins	+	∓	∓	—	—	—
Pool de sérums 1re série	+++	+++	+++	++++	+++	+
Pool de sérums 2me série	+++	+++	+++	+++	++	+
Pool de sérums 3me série	+++	+++	+++	++	++	+

Floculation des suspensions antigène - collodion avec les sérums des animaux témoins et des animaux immunisés (moyenne de plusieurs déterminations).

Précisons que ces anticorps floculants semblent disparaître ou, tout au moins, diminuer avec le temps, puisque les taux de dilution étaient d'autant plus marqués que la récolte du sérum avait lieu plus précocement après la dernière injection immunisante.

Quoi qu'il en soit, il semble bien qu'on puisse mettre en évidence dans le sérum des animaux préparés avec le complexe antigénique cœur - streptocoques, des anticorps capables de réagir *in vitro* avec un extrait myocardique adsorbé à la surface de particules de collodion. Le myocarde dans le complexe antigénique jouerait bien le rôle d'un haptène.

CHAPITRE III

LOCALISATION DES GLOBULINES ANTICORPS

Après avoir montré la présence d'anticorps anticœur dans le sérum de rats immunisés par les méthodes sérologiques de floculation et, conjointement, l'augmentation du taux des gamma-globulines, nous avons pensé qu'il serait du plus haut intérêt de pouvoir étudier la localisation de ces globulines anticœur chez l'animal pour déterminer une fixation élective spécifique sur l'organe correspondant. Une méthode de choix s'offrait à nous : la localisation par marquage des globulines avec l'I 131.

Cette expérimentation ne fut réalisable, répétons-le, que grâce à l'obligeance du Laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, dirigé par M. le Doyen CANALS.

Nous rapporterons d'abord les expériences réalisées dans le même ordre d'idées par d'autres auteurs :

I. EXPERIENCES DE PRESSMAN

PRESSMAN a préparé des rats en leur injectant, pendant deux périodes de quatre semaines, à raison de deux injections par semaine, des extraits de reins de lapin. Ces reins devaient être parfaitement vides de leur sang.

PRESSMAN prélevait le sang une semaine après la dernière injection. Il pratiquait des injections intra-abdominales. Pour déterminer le titre des sérums, il préparait une suspension à 10 % de reins perfusés, jusqu'à ce qu'il n'y ait absolument plus de sang. Après centrifugation, il utilisait la liqueur surnageante comme antigène tissulaire.

La solution d'antigène donne un précipité visible à une dilution aussi grande que 1/1024 avec un égal volume de l'anti sérum après que le mélange ait passé une nuit au frigidaire.

Cet auteur a montré que l'ioduration ne détruisait pas l'activité de l'anticorps. Il a trouvé qu'il y a localisation de la radio-activité dans les reins chez les animaux ayant reçu la fraction globulinique iodée de sérums antirein, tandis qu'il n'y a pas une telle localisation chez des animaux recevant soit la fraction globuline iodée d'un sérum normal, soit la fraction globulinique iodée d'un sérum hétérologue comme le sérum antiovalbumine, par exemple, dans les expériences de PRESSMAN.

Il a retrouvé également un peu de radio-activité dans le foie, les poumons, la rate.

LIBBY et MADISON ont montré que, après 24 heures, 63 % d'une dose de virus de la mosaïque du tabac marqué avec le radiophosphore, apparaissait dans le foie de la souris.

Pour donner une explication de cette localisation des anticorps marqués sur d'autres tissus que le tissu homologué. PRESSMAN pense que c'est dû au fait que rate, foie, rein, font partie du même système réticulo-endothélial.

Dans des expériences ultérieures, PRESSMAN a essayé d'améliorer sa technique de l'ioduration des globulines anticorps.

Il a protégé l'activité de la globuline anticorps en bloquant le groupement actif par un haptène spécifique avant l'ioduration. Il pense protéger la partie spécifique de l'anticorps pendant la réaction.

Il enlève l'haptène par dialyse après l'ioduration et laisse ainsi à l'anticorps son activité originelle.

L'anticorps protégé peut, à nouveau, entrer en combinaison avec un haptène pour donner un complexe stable, puisqu'il n'y a eu aucune « interférence » dans la région de combinaison.

Il était concevable que l'ioduration ou l'oxydation d'une molécule anticorps puisse affecter la région spécifique de combinaison anticorps + haptène homologue.

Nous avons essayé de reproduire des expériences de ce type en utilisant les sérums de rats préparés avec notre mélange antigénique : cœur - streptocoques.

Notons que, dans nos expériences, le composant tissulaire de l'antigène est du cœur du rat, alors que dans les expériences de PRESSMAN, les immunisations des rats sont faites à partir de reins de lapins.

II. EXPERIENCES PERSONNELLES

Pour étudier la localisation des protéines anticorps, nous les avons marquées par l'iode radio-actif. On sait, en effet, que l'iode moléculaire se fixe sur les molécules protéiniques, sans entraîner généralement de modifications de leurs propriétés biochimiques, hormonales et immunologiques.

On injecte ces protéines marquées à des animaux et on détermine au moyen de la radio-activité, leur répartition dans les tissus et les organes.

Voici les résultats que nous avons obtenus concernant l'étude de la localisation de ces iso-anticorps, anti-cœur, anti-streptocoques et, tout d'abord, l'essentiel des différentes étapes expérimentales : isolement des protéines anticorps, marquage des globulines et détermination de la radio-activité des fragments d'organes prélevés.

a) - *Isolement des globulines anticorps.*

Les globulines gamma, supports essentiels de l'activité immunologique, ont été isolées des sérums selon la méthode de fractionnement des protéines des liquides biologiques, mise au point par COHN et ses collaborateurs.

Cette méthode est basée sur le fait que la solubilité des protéines diminue avec l'addition d'alcool au milieu.

Le fractionnement est obtenu en faisant varier le pH et la concentration en alcool.

Cette précipitation par l'alcool, réalisée à température ordinaire, entraînerait une dénaturation des protéines : pour diminuer au maximum cet effet, on doit opérer à des températures suffisamment basses.

En faisant varier les conditions expérimentales (concentration en alcool, force ionique du milieu), ces auteurs ont défini

six méthodes de précipitation qui diffèrent quant à la répartition des diverses protéines dans les fractions obtenues et leur état de pureté.

Nous avons suivi la méthode 6, particulièrement intéressante, puisqu'elle permet d'obtenir les divers composés dans un état très voisin de leur état naturel.

Les auteurs ont donné une description détaillée des diverses étapes et ils ont suivi la composition des fractions obtenues par des mesurés électrophorétiques.

Dans un premier temps, on ajoute au plasma de l'alcool, de façon à obtenir une concentration finale de 8 %. On précipite, dans ces conditions, le fibrinogène (fraction I). Amenant ensuite le liquide surnageant à une concentration en alcool de 25 % et, au moyen d'une solution-tampon acéto-acétique à un pH 6.8, on obtient une fraction constituée par les gamma globulines et une partie des beta-globulines (fraction II).

Pour un pH de 5.2 et en abaissant la concentration en alcool à 18 %, ce sont les alpha-globulines et les lipo-protéines que l'on obtient (fraction III). En ramenant le pH à 5.8 et le pourcentage d'alcool à 40, on finit de précipiter les gamma-globulines (fraction IV). Enfin, à pH 4.8, pour une concentration en alcool de 40 %, on sépare l'albumine (fraction V).

Toutes ces précipitations, s'effectuant dans des milieux contenant une forte proportion d'alcool, on peut abaisser la température au-dessous de zéro degré sans crainte de congélation. Ces séparations sont, en effet, effectuées à des températures comprises entre — 5° et — 10° ; d'autre part, l'addition d'alcool et de tampon au sérum doit être fait au moyen de tubes capillaires et doit être très lente, de façon à éviter les surconcentrations locales et diminuer encore les possibilités de dénaturation.

Dès lors, nous avons opéré comme suit :

Le sang des animaux (rats blancs), est recueilli dans des tubes à centrifugation, le caillot détaché, et le sang conservé à 0° pendant quelques heures. Le caillot se rétracte ; on le sépare du sérum par centrifugation. Dans ces conditions, on sépare

la fibrine et pour obtenir les beta et gamma-globulines, il faut réaliser d'emblée les conditions de séparation de la fraction II imposées par la méthode de Cohn :

pH = 6.8 - 6.9 ; alcool à 25 %

Le sérum recueilli est refroidi à 0° et mis dans un mélange de glace et sel à 3 %, de façon à avoir une température qui baisse de 0 à —3° ; on introduit pendant ce temps le mélange alcool-tampon : c'est de l'alcool à 45 % contenant % 14,4 cm3 du tampon acéto-acétique suivant :

Acétate de soude	2 M.	1 cm3 pour 100 cm3 d'eau
Acide acétique	10 M.	1 cm3 pour 100 cm3 d'eau

Il faut ajouter 1,42 cm3 de ce mélange à 1 cm3 de sérum pour que le mélange final soit de l'alcool à 25 % et ait le pH voulu (6,83 avec notre solution tampon, comme nous l'ont montré des essais préalables).

L'addition est faite très lentement.

Pour précipiter les globulines de 5 cm3 du sérum, soit pour ajouter 7,2 cm3 d'alcool-tampon, nous avons mis 1 heure environ. Au milieu de la précipitation, nous avons remplacé le mélange glace-sel à 3 % par un mélange à 6 %. On peut ainsi atteindre des températures de —5° et au delà.

Le précipité ainsi obtenu était parfaitement rassemblé et on pouvait le séparer du liquide surnageant par simple décantation.

Le précipité est alors dissous dans de l'eau et prêt pour l'ioduration.

Les prélèvements de sérum, de liqueur surnageante et de globulines sont alors soumis à l'électrophorèse. Nous avons pu vérifier que le précipité était constitué, comme prévu, de globulines beta et gamma et ne contenait que des traces infimes des autres protéines du sérum.

Nous avons voulu, dans une série d'expériences, administrer aux animaux toutes les globulines alpha, beta, gamma. Nous avons dû alors modifier la technique précédente de précipitation. Nous avons vu que la méthode de Cohn permet

d'obtenir successivement, mis à part le fibrinogène, les beta et gamma-globulines, les alpha-globulines, une partie des beta-globulines qui n'avait pas précipité avec la fraction II et, enfin, l'albumine. Pour isoler la totalité des globulines, il fallait donc se placer dans les conditions de précipitation de la fraction IV, pH 5.8, concentration finale en alcool à 40 %. Cette précipitation était évidemment réalisée comme précédemment : addition très lente de l'alcool-tampon, température très base : — 5°.

L'analyse électrophorétique a confirmé que le précipité renfermait les globulines alpha, beta et gamma, à l'exclusion de l'albumine.

b) - *Marquage des globulines.*

Plusieurs isotopes radio-actifs ont été utilisés dans les recherches immunologiques, pour marquer les protéines antigènes ou anticorps, le soufre S 35, le phosphore P 32 et l'iode I 131.

On prépare des sulfo-protéines, des iodo-protéines, ou bien on introduit un atome de phosphore radio-actif au moyen de chlorure de phosphore marqué.

Cependant, le soufre et le phosphore ont été peu utilisés jusqu'ici. Les sulfo-protéines sont étrangères pour l'organisme animal et leur injection peut diminuer la formation d'anticorps spécifiques. Le traitement par le chlorure de phosphore modifie profondément les propriétés immunologiques et chimiques des protéines, en particulier des protéines du sérum et de l'ovalbumine ; d'autre part, la partie marquée de la molécule n'est pas toujours solidement fixée.

C'est, en effet, l'iode radioactif qui a été le plus utilisé pour le marquage des molécules protéiques.

Cette préférence s'explique aisément :

L'iode se fixe facilement et solidement aux molécules de protéines ; cette fixation n'entraîne pas de modifications notables des propriétés des molécules marquées.

Eisen et Keston ont pu montrer la stabilité du marquage radioactif en mesurant, au cours du temps, la quantité de radioactivité qui suit la protéine dans la précipitation par l'acide

trichloracétique. Ces auteurs ont trouvé que, après un stockage d'un mois à 4°, la quantité de radio-iode, précipitant avec la protéine, n'avait pas changé.

En ce qui concerne les propriétés des molécules marquées, il semble que, dans une faible mesure, l'ioduration directe puisse faire perdre à la protéine un peu de sa spécificité antérieure et lui faire acquérir des propriétés nouvelles. L'importance de tels changements dépend du rôle joué par l'amino-acide marqué dans la spécificité de la molécule et de la quantité d'iode fixée. Avec le I. 131 que l'on obtient « Carrier-free » et de très haute activité spécifique, on peut préparer, *in vitro,* des protéines suffisamment marquées et contenant assez peu d'atomes d'iode pour que leur structure ne soit pas altérée et que leur spécificité immunologique primitive soit conservée. C'est ce que Eisen et Keston ont pu démontrer. Comparant les réactions de précipitation de la sérum-albumine naturelle de lapin et de la sérum-albumine faiblement marquée, ces auteurs ne relèvent aucune différence fondamentale : les antigènes présentent la même capacité de former un précipité spécifique avec l'antisérum. De même, Pressman a pu montrer que l'iode est précipité spécifiquement avec les anticorps marqués et sans détruire leur spécificité.

Différentes méthodes ont été préconisées pour réaliser l'ioduration des protéines.

Boursnell et ses collaborateurs ont ioduré les protéines en présence d'ammoniaque diluée. On introduit ainsi 0,65 à 1 % d'iode dans certains anticorps sans baisse appréciable de leur pouvoir précipitant. Cependant, cette méthode pourrait entraîner une certaine altération chimique des protéines instables comme les sérums globulines.

La plupart des chercheurs, employant des protéines radio-iodées ont ioduré en traitant la solution de protéines alcalinisées par addition d'un tampon de pH 8 à 9, avec une solution d'iode dans l'iodure de potassium, contenant une quantité de radio-iode. Après un temps de contact assez court, l'excès de radio-iode peut être réduit en ajoutant une solution de thiosulfate. Les iodures diffusibles sont ensuite enlevés par dialyse. Des anticorps ainsi marqués ont été étudiés par Pressman et par Butement.

C'est un procédé analogue que EISEN *et* KESTON ont utilisé pour marquer la sérum-albumine ; précisons, toutefois, que les auteurs libèrent l'iode de l'iodure de potassium au moyen du nitrite de sodium avant de le mettre en contact avec la sérum-albumine.

Dans nos expériences, nous avons suivi la technique d'ioduration décrite par PRESSMAN.

— La fraction globulinique précipitée est reprise par l'eau et se dissout en grande partie. L'ioduration est réalisée à basse température (— 5°). On ajoute une solution de radio-iode à une solution d'iode dans l'iodure de potassium (nous préciserons plus loin la teneur en iode). On laisse quelques minutes en contact ; on ajoute du bicarbonate de sodium pour avoir un pH 8 à 9 ; on verse goutte à goutte, comme le préconise LISSITZKY pour l'ioduration à la thyroxine, cette solution dans la fraction globulinique maintenue, elle aussi, à — 5°. Après 20 minutes de contact, la solution est dialysée contre de l'eau à 0°. Dans les premières expériences, nous avons dialysé contre 50 cm3 d'eau, renouvelée toutes les demi-heures pendant les premières heures. La durée totale de dialyse était de 60 à 72 heures. Dans les expériences III (Lots n^{os} 3 bis et 6), pour éviter une destruction possible au cours du temps, nous avons accéléré la dialyse en multipliant les renouvellements d'eau distillée, en prenant des dialyseurs de plus grande surface et en faisant dialyser contre un volume d'eau distillée quatre fois plus grand.

Nous avons pu ainsi abaisser la durée de la dialyse à 10 heures.

Ajoutons, pour préciser, que le dernier dialysat enlevait par heure 5 à 7 % de la radio-activité totale restant dans le dialyseur. Le réactif radioactif non lié à la protéine n'était donc pas complètement éliminé par les dialyses. Dans le cas de nos expériences, ceci n'était pas gênant ; nous en verrons plus loin la raison.

Une partie de la solution à dialyser était soumise, avant l'injection à l'animal, à l'analyse électrophorétique pour vérifier la présence des gamma-globulines.

Concentration de la solution iodurante.

Nous avons vu que selon la quantité d'iode fixée dans la molécule protéique, les propriétés peuvent être plus ou moins modifiées ; il est donc nécessaire d'utiliser pour l'ioduration des solutions d'iode de concentration bien choisie.

Dans les premières iodurations que nous avons réalisées (expérience II, rats 1 à 4), nous basant sur les données de PRESSMAN, nous avons mis en œuvre des quantités d'iode de 4 mg. par cm3 de sérum soumis au fractionnement.

Par la suite, nous avons eu connaissance de la technique employée par ROCHE et LISSITZKY pour l'ioduration de la thyroxine et nous avions été amenés à abaisser la quantité d'iode à 0,13 mg. par cm3 de sérum (Expérience III, Lots 2 et 3).

Enfin, dans les expériences III, lots 3 bis et 6, nous avons encore diminué cette concentration et employé 0,04 mg. d'iode par cm3 de sérum, soit 6 mg. de gamma-globulines.

Cette concentration est tout à fait en accord avec celle qu'indiquent EISEN et KESTON qui utilisent pour 10 mg. de protéine (sérum-albumine), 0,06 mg. d'iode.

Malgré les différences très importantes dans les quantités d'iode mises en œuvre, la comparaison des différentes expériences ne nous permet pas de mettre en évidence une dénaturation, même partielle, des produits injectés.

c) - *Expérimentation sur l'animal.*

Les protéines iodées ont été administrées à des rats blancs par injection intra-péritonéale. La quantité de produits administrée par animal, représentait les globulines gamma ou totales obtenues à partir de 1 cm3 de sérum. Les quantités injectées ont été du même ordre de grandeur que celles qu'utilisait PRESSMAN dans son étude de la localisation des anticorps antirein.

Pour la durée de survie, nous nous sommes encore conformés à la technique de PRESSMAN et nous avons adopté 48 heures. Ce temps écoulé, les animaux étaient anesthésiés à l'éther ; on prélevait un échantillon de sang et on perfusait avec du

ClNa à 0,9 % par l'intermédiaire d'un catheter introduit dans la veine jugulaire ; le liquide perfusant sortait par les deux veines fémorales incisées. Ces perfusions étaient poursuivies jusqu'à ce que le liquide recueilli à la sortie des veines fémorales soit du sérum physiologique. On la maintenait encore un moment, de façon à priver le plus complètement possible les organes de leur sang.

On prélevait alors les tissus ou organes choisis : rein, foie, poumon, cœur, rate, muscles en vue de la mesure de leur radioactivité.

Pour cette mesure, nous avons employé la méthode décrite par Sue ; elle consiste dans la mesure directe de la radioactivité de la substance prélevée étalée en couche suffisamment mince pour que les pertes par auto-absorption du rayonnement émis soient négligeables.

Une lame d'aluminium de 1/10e de m/m. d'épaisseur, d'une longueur égale à la circonférence du compteur utilisé, soit 6 cm. et d'une largeur égale à la zone de sensibilité maxima du compteur, est fixée sur un support de carton de dimensions bien déterminées. On constitue ainsi un « porteur ». Une partie du tissu ou de l'organe frais prélevé, 50 mg. environ, est étalée uniformément sur la feuille d'aluminium ; on l'emprisonne à l'aide d'une feuille de cellophane adhérant au support. Le produit est aplati, le support de carton roulé sur lui-même à l'aide d'un mandrin dont le diamètre est celui du compteur et collé. Le support de carton permet de placer dans une position fixe la préparation autour du compteur.

Les mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique et qui comprend essentiellement :

— le tube de Geiger et sa protection de plomb, destinée à éliminer, dans la mesure du possible, les rayonnements parasites ;

— la source de haute tension stabilisée, destinée à alimenter le tube de Geiger ;

— le numérateur ou totalisateur mécanique.

Le numérateur permet de déterminer avec un compte-secondes, le nombre N de rayons traversant le tube par unité de temps, N est exprimé en coups/minute (C/M).

Dans cette étude, nous avons exprimé les résultats ainsi qu'il suit :

Faisant des mesures relatives nous avons, pour chaque série d'expériences, préparé un porteur étalon, obtenu en évaporant à l'infra-rouge un volume connu, 1 cm3 en général d'une dilution appropriée des globulines iodées administrées.

L'activité des différents échantillons et de l'étalon correspondant à une même série d'expériences sont corrigés du mouvement propre (faible radioactivité due au rayonnement cosmique, aux poussières radioactives de l'atmosphère et enregistrée par le compteur en l'absence de source radioactive).

Toutes les mesures d'une même série d'expériences ayant été faites le même jour, nous n'avons pas eu à corriger nos résultats de la décroissance du radio-élément.

Connaissant les poids des échantillons, on ramène la radioactivité au milligramme de tissu ou d'organe.

Compte tenu des dilutions que l'on a fait subir aux prélèvements étudiés, on calcule l'activité de la dose administrée aux animaux. On peut alors calculer le pourcentage fixé par gramme de tissu du produit administré. Les résultats consignés dans le tableau ont été exprimés ainsi : tous les nombres ont été multipliés pour faciliter la présentation.

RESULTATS

Pour étudier la localisation des iso-anticorps anticœur streptocoques, il nous a paru bon de réaliser les trois séries d'expériences suivantes :

1. Répartition de l'iode marqué chez l'animal.

Cette expérience devait nous permettre de vérifier le point suivant : nous avons vu que la dialyse enlève des quantités d'iode très importantes aux globulines et que, même après trois jours, il passe par heure 7/1000e d'iode marqué. Le produit injecté est donc un mélange de protéines iodées marquées et d'iode radioactif.

Il fallait vérifier que, 48 heures après administration, la fixation de cet iode libre n'était pas susceptible de masquer, tout au moins en partie, celle des protéines.

Pour cela, nous avons administré au rat une solution d'iode marqué dont la concentration en iode était de l'ordre de celle des solutions après dialyse. D'après les quantités dialysées, nous avons pu calculer que la quantité d'iode administré par animal correspond à 1 cm3 d'iode N/25.000. C'est cette dose que nous avons administrée à un rat (Expérience I).

Les réponses données par les différents tissus ou organes sont très faibles ; nous verrons plus loin quelles conclusions on peut en déduire.

2. Répartition des gamma-globulines iodées normales chez le rat.

Une localisation éventuellement spécifique des globulines anticœur-streptocoques ne pouvait être mise en évidence qu'en comparant leur répartition dans l'organisme animal à celle des globulines normales non spécifiques.

A cet effet, nous avons isolé les globulines d'un sérum normal de rat, nous les avons iodurées et administrées à des rats. Après quarante-huit heures, nous avons trouvé des concentrations radioactives telles qu'elles se trouvent sur le tableau (Expérience II).

Nous voyons tout de suite que c'est évidemment le sang qui retient la majorité des gamma-globulines. Les autres tissus ou organes en ont fixé beaucoup moins, thyroïde excepté, bien entendu.

3. Répartition des globulines anticœur-streptocoques.

Les résultats des expériences réalisées avec les sérums de rats traités sont consignés dans le tableau (Expérience III).

Dans ce cas, nous avons porté toute notre attention sur le cœur, qui aurait pu être un point d'élection pour fixer les globulines. Nous en avons prélevé trois parties :

1° Endocarde gauche ;

2° Myocarde gauche ;

3° Myocarde droit.

De la confrontation générale de ces divers résultats, nous pouvons dégager les points suivants :

1° De l'expérience I, on peut conclure que l'iode libre non enlevé par les dialyses, a été à peu près totalement éliminé par l'animal et retenu par sa thyroïde, et ne se fixe qu'en quantité très faible dans ses organes ;

2° Dans l'expérience II, on voit la localisation spécifique des gamma-globulines. Leur lieu d'élection est le sérum ; la concentration la plus forte, et de loin, se retrouve au niveau du sang, concentration plus forte dans le poumon (organe le plus difficilement lavable dans les premières expériences) ;

3° En confrontant les expériences I et II, on peut souligner que la présence d'une petite quantité d'iode libre ne peut, en aucun cas, masquer une localisation spécifique, les pourcentages retenus au point électif de localisation variant dans le rapport de 1 à 30 ;

4° Toujours en confrontant les expériences I et II, on remarque une forte proportion de gamma-globulines dans le sang, ce qui ne doit pas surprendre, puisque le sérum est le véhicule normal des globulines sériques ;

TABLEAU

DES CONCENTRATIONS RADIO - ACTIVES *(Suite)*

TISSUS ou ORGANES PRELEVES	EXPE-RIENCE I I 131 seul	EXPERIENCES II Sérum normal				
	RAT 1	RAT 2	RAT 3	RAT 4	RAT 5	R
Sang	2,1	72	61	32	76	4
Foie	3	14	6,6	9,3	9,3	
Rein	3,5	6,5	9,6	8,9	—	
Rate	1,5	12	8,7	6,3	11,2	
Poumon	1	28	20	11	17,7	
Muscles	1	—	—	—	—	
Cœur	1,4	7,2	6	5,1	8,1	
(1)						
(2)						
(3)						

TABLEAU

DES CONCENTRATIONS RADIO - ACTIVES

OT N° 2		EXPERIENCES III sérum anticœur-streptocoques				LOT n° 6	
		LOT N° 3		LOT n° 3 bis (*)			
1	RAT 2	RAT 1	RAT 2	RAT 1	RAT 2	RAT 1	RAT 2
	31,1	23,5	28,4	72,6	57,7	31,9	38,9
9	10,7	7,1	10	5,9	3	8,7	6
4	14,1	6,1	6,6	7,1	4,3	10,7	11
8	8,6	4,3	8,3	4,1	6,1	4,7	4,6
3	7,4	3,4	12	9,3	6	3,9	5,1
2	3,2	1,8	3,8	5,6	4,1	2,2	2,7
	—	—	—	—	—	—	—
9	3,3	2,4	2,6	4,6	2,6	2,7	2,4
5	3,5	3,8	5	3,9	1,8	2,7	2,7
9	3,7	2,4	3,6	4,5	2,7	2,4	2,7

) Lot spécial d'animaux mis en réserve pendant 3 semaines, sans jections.

5° En confrontant les expériences II et III, on constate :

— L'absence d'une fixation élective de ces globulines marquées au niveau du cœur ;

— mais, par contre, foie et reins concentrent bien davantage ces globulines marquées.

Dans l'expérience III, le lot n° 3 est un lot d'animaux qui est resté plus d'un mois sans subir d'injections sensibilisantes (ces rats étaient restés à Montpellier où étaient réalisées toutes les expériences sur l'iode radioactif). Or, le sérum de ces animaux contenait très peu de globulines anticorps et l'ioduration de ces gamma-globulines sériques n'a dû intéresser que les seules globulines normales ou presque. Ceci explique bien leur répartition à peu près uniforme dans les différents organes du rat d'expérience, sans participation particulière du foie et du rein.

On peut conclure qu'il ne semble pas qu'il y ait une fixation des anticorps sur l'organe ayant servi à préparer les antisérums. Il serait intéressant de reprendre les expériences en utilisant aux fins d'immunisation des organes tels que le cœur, le foie, le rein et de comparer les résultats.

De même, il faudrait préparer les antisérums de rein, de rat ou de cœur de rat d'une part chez le rat, d'autre part chez le lapin et d'en étudier à nouveau, chez le rat, la répartition des gamma-globulines iodées.

Nos résultats ne sont pas en contradiction avec ceux qu'ont obtenus d'autres expérimentateurs ; ils retrouvent l'iode marqué à une concentration un peu plus forte dans tel organe. mais également dans le foie, les reins et les poumons.

Il nous paraît intéressant de rappeler l'expérience d'Harisson-Latta. Cet auteur sensibilise des lapins par des injections de gamma-globulines bovines ou de sérum-albumine humain. Il a essayé d'étudier la répartition de ces gamma-globulines dans les différents organes du lapin. Il constate une hyper-concentration thyroïdienne et sanguine et une répartition à peu près égale dans tous les organes. Mais aussi — et c'est le fait qui nous intéresse — une élimination très rapide de ces protéines iodées par les voies urinaires.

On peut conclure que les résultats de nos expériences sont en accord avec celles qui ont été réalisées dans le même sens, mais nous les interprétons de la manière suivante : nous n'avons pas constaté de fixation homotissulaire des anticorps, mais nous avons retrouvé l'iode marqué fixé sur les gamma-globulines, dans les organes de détoxication, foie et reins.

CHAPITRE IV

CONSTATATIONS HISTOPATHOLOGIQUES

Préparation des coupes.

Les cœurs de rat, après prélèvement, ont été immédiatement fixés dans le formol salé (NaCl = 8 % - formol = 10 %).

Deux colorations ont été pratiquées :

— hématéine éosine ;

— Van Gieson.

Constatations histopathologiques.

Nous avons étudié les coupes de 15 cœurs d'animaux préparés, soit par le mélange myocarde + streptocoque A, beta-hémolytique, soit myocarde seul de rat. Quatre coupes témoins (animaux normaux), ont été comparées aux coupes précédentes.

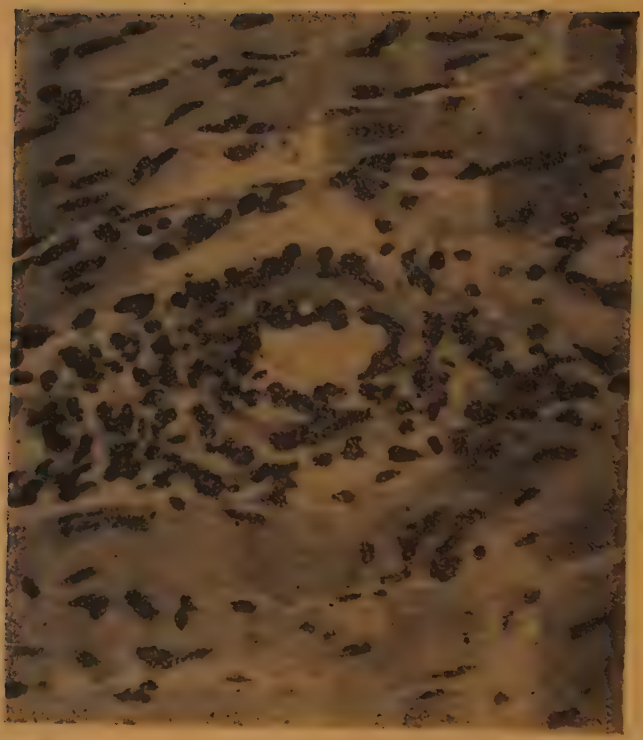
Les détails histologiques ayant été décrits dans la thèse de P. Bernard, nous ne relaterons ici que les conclusions.

Remarquons toutefois que les lésions observées sont du même type, à des degrés divers, chez les animaux préparés avec le broyat de myocarde seul et le myocarde + streptocoques.

1° Type lésionnel.

Il est constitué par une réaction essentiellement concentrée autour de petits vaisseaux artériolo-capillaires.

Sur les coupes où les réactions sont très intenses, celles-ci forment des traînées ou de véritable nodules bien visibles au sein du myocarde.



Coupes de cœur de Rats préparés par le mélange MYOCARDE + STREPTOCOQUE

2° Structure de la réaction.

C'est une réaction à fibrocytes, fibroblastes ou histiocytes auxquels viennent se joindre assez rarement quelques cellules libres lymphocytaires ; la coloration de Van Gieson a permis d'objectiver la prolifération des fibres.

La paroi propre des petits vaisseaux paraît elle-même proliférer et la lumière en est souvent obstruée. Sur les coupes où l'activation est particulièrement intense, on peut noter la prolifération diffuse des éléments interfibraires. On a noté également sur les coupes intéressant la région sous-endocardique (piliers), des amas de noyaux denses analogues à des noyaux d'histiomonocytes.

La fibre myocardique elle-même ne présente pas de gros troubles dégénératifs, hormis la mauvaise visibilité de la striation.

3° Répartition des lésions.

Il ne s'agit pas d'une réaction diffuse et homogène mais, au contraire, plutôt variable d'un point à un autre. Sur de rares coupes, on discerne des zones où la réaction paraît se faire indépendamment du vaisseau (région épicardique surtout).

Enfin, l'activation paraît plus intense au niveau des espaces conjonctifs de la base indépendamment des vaisseaux (valvules, cordages et piliers).

4° Histologie des myocardes témoins.

Aucune réaction d'activation au niveau de l'interstitium.

Conclusions.

Présence indiscutable de lésions de « myocardite interstitielle » secondaire à une activation du type hyperergique au niveau du tissu conjonctif interfibraire.

Ces lésions sont assez comparables à celles de l'endomyocardite rhumatismale.

Remarque.

Les lésions histologiques observées chez les rats préparés avec l'antigène myocarde + streptocoques sont sensiblement du même type que celles décrites par CAVELTI.

Par contre, nous avons pu noter des réactions d'activation importantes sur des myocardes de rats préparés avec du broyat de cœur seul.

Il semblerait donc, *a priori,* qu'un tissu normal puisse se montrer antigénique et déclancher ainsi la formation de véritables auto-anticorps dans le sens strict du mot.

Nous pensons que le traitement physique que nous avons fait subir au myocarde et consistant en un broyat soigneux. associé à une possible dénaturation, même légère, de la structure chimique de l'organe due au fait qu'il se trouve hors de son hôte, ont suffisamment modifié sa nature pour qu'il soit devenu étranger et donc antigénique.

Ce fait nous paraît à retenir, car il démontre qu'une lésion, si minime soit-elle, est capable de transformer une cellule, un tissu ou un organe de telle façon que l'organisme est devenu incapable de le reconnaître comme lui ayant appartenu.

CONCLUSIONS

Reprenant les expériences de CAVELTI comme point de départ de notre travail, nous avons essayé de démontrer la formation d'iso-anticorps myocardiques chez le rat traité par des injections répétées de broyat de cœur de rat, additionné de cultures de streptocoques A beta-hémolytiques.

Dans une première étape, nous avons tenté d'objectiver la production d'anticorps :

1° Par l'étude électrophorétique des sérums de rats en cours et en fin d'immunisation.

Nous avons observé une augmentation du taux des gamma-globulines, qui témoigne classiquement d'une production d'anticorps ;

2° Grâce à une réaction de floculation de particules de collodion ayant adsorbé un broyat de myocarde, nous avons pu montrer l'apparition d'anticorps floculants spécifiques anticœur ;

3° Par l'examen anatomo-pathologique, il nous a été permis de mettre en évidence des lésions de myocardite interstitielle avec une réaction essentiellement concentrée autour des petits vaisseaux artériolo-capillaires.

Ces lésions paraissent secondaires à une activation du type hyperergique au niveau du tissu conjonctif interfibraire.

Ayant observé, d'autre part, des lésions du même ordre chez des animaux sensibilisés uniquement avec un broyat de myocarde, nous émettons l'hypothèse, qui paraît fondée, d'une modification de structure minime du tissu cardiaque, mais suffisante cependant pour le rendre étranger à l'organisme.

Dans une deuxième partie, nous avons tenté de préciser la localisation des anticorps anticœur contenus dans les sérums des rats hyperimmunisés lorsqu'on les injectait à des animaux neufs, grâce au marquage des globulines par l'I. 131.

Contrairement à ce qu'il eût semblé logique de penser, ces anticorps ne se fixent pas électivement sur l'organe ou le tissu homologue, mais se retrouvent au niveau des organes de « transformation » : le foie, et d'excrétion : le rein.

Il est possible, cependant, que le protocole expérimental décrit n'ait pas permis la réalisation de notre hypothèse.

En effet, le délai de 48 heures séparant l'injection des globulines marquées du sacrifice de l'animal, est peut-être mal choisi.

Il conviendrait d'autre part, de préciser la localisation des globulines anticorps marquées, non plus chez des animaux neufs, mais chez les animaux sensibilisés.

Le concept d'agression par auto-anticorps, à la suite de très nombreux travaux, semble donc capable d'expliquer la génèse d'un grand nombre de maladies dont l'étiologie jusqu'alors était inconnue.

Cependant, s'il nous est permis de supposer dans certains cas un mécanisme d'auto-agression, nous ignorons souvent la nature du facteur extrinsèque qui vient modifier la structure de la cellule, du tissu ou de l'organe pour le rendre étranger, donc antigène, pour l'organisme auquel il appartient.

Ces facteurs nous semblent être de divers ordres : physique-chimique ou mieux physico-chimique, viral, microbien, néoplasique.

Nous avons pu nous rendre compte que le simple broyage, la dilacération des fibres myocardiques suffisait à rendre ce tissu antigène par modification de structure.

Il est possible de supposer aussi que certaines substances médicamenteuses, certains antigènes microbiens ou viraux des cellules néoplasiques ou les produits de leur métabolisme soient capables de modifier une cellule, un tissu, un organe pour qu'ils deviennent à ce point méconnaissables que l'organisme de l'hôte les considère comme étrangers.

Cette modification peut être profonde et atteindre la structure intime de la cellule ou altérer simplement sa surface. Si nous considérons, par exemple, une hématie, nous pouvons concevoir l'adsorption à sa périphérie de colloïdes étrangers ou de particules de virus venant conférer à celle-ci une spécificité nouvelle.

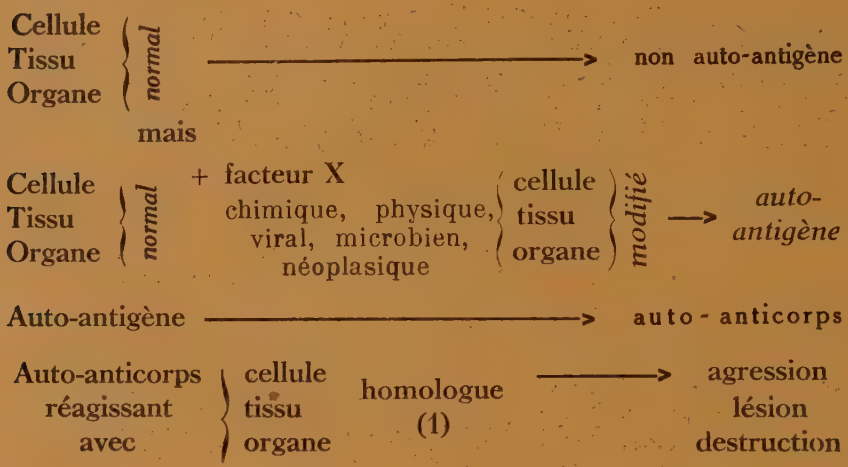
Qu'il nous soit permis, cependant, de supposer que le tissu jouerait en quelque sorte, dans certains cas, le rôle d'un haptène, et dans d'autres, celui d'un co-antigène qui, s'unissant avec le facteur étranger, donnerait naissance à un nouvel antigène à double spécificité. C'est le cas du mélange cœur + streptocoque qui déclenche la formation d'anticorps anticœur et antistreptocoques.

Une dernière hypothèse serait enfin la suivante :

Supposons que l'organisme soit en contact avec une substance chimique X antigénique qui, dans sa molécule, renferme une fraction commune à une cellule, un tissu ou un organe normal de l'hôte.

Ce dernier, en réponse à l'antigène, va fabriquer des anticorps antisubstance X, mais aussi vis-à-vis de ses propres cellules, puisqu'il existe dans la mosaïque d'antigène un facteur commun.

Reprenant les conceptions de DAMESHEK, nous pouvons, pour conclure, schématiser les processus d'auto-agression de la façon suivante :



(1) La spécificité tissulaire peut, dans certains cas, paraître assez lâche, comme en témoignent les expériences de DELAUNAY et Coll. sur les anticorps anti-rein, qui lèsent le rein et le testicule.

LU ET APPROUVÉ.
Le Président du Jury :
J. BRAHIC.

VU ET APPROUVÉ.
Pour le Doyen, l'Assesseur :
J. DELPHAUT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Aix, le 3 Juin 1955
Le Recteur : BLACHE.

BIBLIOGRAPHIE

AERGATER (E.) et LONG. — The collagen disease. *The Amer. J. of the Med. Sc.*, Sept., 1949, vol. 218, n° 3.

ARBOUYS, FINE, EYQUEM. — Contribution à l'étude électrophorétique du sérum des rongeurs. *Annales Institut Pasteur*, T. *87*, n° 2, p. 169-174.

BENHAMON (Ed.) et POLONOVSKI. — Electrophorèse sur papier, applications chimiques. *Annales de Biologie Clinique*, n° 1-2, Janvier-Février 1953.

BERNARD (R.). — Le rhumatisme scarlatin, 1950.

BERNHEIMER (A. W.), GILMANN, HOTTLE et PAPPENHEIMER. — Milieu synthétique pour la culture des streptocoques hémolytiques. *Journal of Bast.*, T. *43*, p. 495, 1942.

BORDET (J.). — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Masson, 1939.

BORDAT (P.). — Chimie des anticorps. *Le Scalpel*, 103, n° 14, 8 Avril 1950.

BORDET (P.). — Les anticorps microbiens dans les états allergiques *Acta Allergologica*, suppl. 1, 92-105, 1950.

BOURSNELL et Coll. — Nature, Lond., *160*, 339, 1947.

BROWN (P.), WICHELHAUSEN, MERCHANT et ROBINSON. — A study of the antigen-antibody mecanism in rheumatic diseases. *Am. J. of Med. Sciences*, 221, n° 6, Juin 1951.

BUTEMENT. — Nature, Lond., *162*, 731, 1938. *J. Chem. Soc.*, p. 5. 408, 1949.

CAVELTI (P. A.). — Le rôle pathogénique des auto-anticorps. *Médecine et Hygiène*, n° 203 bis, 23 Sept. 1951, p. 351.

CAVELTI (P. A.) et CAVELTI (A. S.). — Etudes sur la pathogénie de la glomérulo néphrite aiguë et de la fièvre rhumatismale. *Archives of Pathology*, 1945, 39, 148 - 1945, 40, 163 - 1947, 44, 1 - 1947, 44, 119.

CAVELTI (P. A.). — Technique de la particule de collodion. *Journ. of Immunology* 49, 1944, p. 365.

CARBALLO (J. R.). — Pathologie du tissu conjonctif, inflammation et allergie. *Rivista Clin. Espanola*, 46, n° 5, 30 Juin 1952.

CHEVILLARD (L.). — Arthrites expérimentales. *Revue du Rhumatisme* 19, n° 12, Déc. 1952.

COHN et Coll. — *J. Amer. Chem. Soc., 68* (1), 465, 1946.

COSTE (F.). — Leçon inaugurale. *Sem. des Hôp.*, 6 Mars 1949.

DACIE (J.). — Sur le rôle des auto-anticorps dans la maladie hémolytique humaine. *Revue d'Hématologie*, 6, 3, 1951, 267.

DAMESHEK M.-W. — 5e Congrès International d'Hématologie. Sept. 1954. Immuno-hematology developpement of a Concept.

DE BRUX (J.). — Constitution histo-chimique de la substance fondamentale et maladies « dites du collagène ». *Presse Méd.*, n° 31, mai 1951, p. 627.

EISEN et KESTON. — *Journal of immunology, 69*, 70, 1949.

FRANCIS (G.-E.). — L'emploi des isotopes en immunologie. — Coll. d'immunochimie. Biochimie. *J. of G. B.*, 1953, 53, n° 2.

FRIEDLANDER (H.), HABERMANN (R.-T.) et PARR (L.W.). — Arthrite expérimentale chez le rat albinos et la souris produite par les streptocoques du type. *The Journal of Inf. Dis.*, 88, n° 3, mai-juin 1951.

GIRAUD (P.), BERNARD (R.) et ROUSSEL. — La fièvre rhumatismale dans ses rapports avec les autres fièvres de nature allergique. *Sem. des Hôp.*, n° 50, 2 juillet 1948.

GJOCKIE et PREKUPEC. — Le problème de la formation des auto-anticorps antitissus du corps humain. *Acta Medica Iugoslavia*, 6, 2 mars 1952.

GLYNN (L.-E.). et HOLBOROW (E.). — Conversion des polyosides tissulaires en auto-antigènes par le streptocoque homolytique. *The Lancet*, 263, 6732, 6 sept. 1952.

GRABAR (P.). — Origine et rôle des anticorps et des globulines du sérum. *Ann. Inst. Pasteur*, T. 79, n° 5, 640-653.

GRABAR (P.). — Les globulines du sérum sanguin. Masson, édit., Paris, 1947.

GUTIERREZ (E.-S.) et PENALVER (J.-A.). — Maladies provoquées par les auto-anticorps. *Revista de l'Association Medica Argentina, 66*, 729, 15 juillet 1952.

HALPERN (B.-N.) et LHERMITTE (F.). — Note préliminaire sur l'encéphalomyélite allergique expérimentale. *Soc. de Biol.* Séance du 11 mars 1950.

HAYES (S.-P.), DOUGHERTY et GEBHARDT. — A method for the demonstration of tissue antibodies. *Proc. Exp. Soc. Biol., and Medicine*, 1951, 76, n° 3, 460-462.

JUSTIN-BESANÇON. — Myocardite expérimentale of tissue conjonctif. *Sem. des Hôp.*, n° 40, 20 juin 1953.

KABAT (E.-A.) et BEZER. — Production rapide d'encéphalomyélite aiguë disséminée chez le singe Rhésus, par injection de substance cérébrale homologue et hétérologue avec adjuvants. *J. of Exp. Med.* 1947, n° 85, 117-130.

KOBERNICK (S.). — Pathologie et bactériologie : cordite rhumatismale expérimentale, péri-artérite noueuse et glomérulonéphrite. *The Ann. J. of Med. Sc.*, 224, n° 3, septembre, 1952.

LATTA (H.). — Hypersensibilité expérimentale chez le lapin. Concentration dans le sang et les tissus de protéines étrangères marquées par l'I. 131 et injectées par voie veineuse. *Journal of Immunol.*, 1951, n° 6.

LEMAIRE (A.). — Les maladies par auto-agression. *Presse Méd.*, 14 janvier 1953, n° 3.

LIEVRE, LIEVRE et HUBAULT. — Les maladies dites du collagène. Exposé historique et critique. *Sem. des Hôp.*, n° 2, 6 janvier 1953.

MACKEE (K.-F.) et SWINEFORD (O.). — Sensibilisation par tissus homologues. *Ann. Reum. Diseases G. B.*, 1951, T. 10, n° 2.

MOESCHLIN (Sven). — Immuno-leucopénie et immuno-agranulocytose *Rev. d'Hématologie*, T. 8, n° 3, 1953.

MURPHY (A.-C.) et SWIFT. — Apparition de lésions cardiaques semblables à celles du rhumatisme chez le lapin, à la suite d'injections locales répétées de streptocoques du groupe A. *The journal of Exp. Med.*, 31, n° 5, mai 1950.

POURSINES (Y). — Sur l'obtention expérimentale de splénisation du poumon par choc allergique tuberculinique local chez le cobaye tuberculeux. *Revue Méd. du Moyen-Orient* 1948, n° 1.

POURSINES (Y.), JOBARD et ROGER. — Les encéphalites allergiques de nature infectieuse. XLVIII[e] Congrès des Médecins neurologistes et aliénistes de France. Besançon, juillet, 1950.

PRESSMAN et SHERMAN. — *J. of Immunol.*, 50, 141, 1948 ; 66, 609, 1951.

SAINT-PAUL (B.). — Le problème immunologique des auto-anticorps. Thèse Paris, 1950, 624.

STEFANINI (M.) et MEDNICOFF (I.-B.). — Démonstration expérimentale de l'existence d'anticorps antivaisseaux dans le sang de malades atteints de purpura et de périartérite noueuse (Résumé in *Rev. du Prat.*, 21 juin 1954, p. 1688).

STREHLER (E.). — Glomérulonéphrite et endocardite chez des lapins après injection d'immun-sérum antiaorte. *Schweitz Méd. Woch.*, 1951, 81, n° 5.

SUE. — *J. of Chim. Phys.*, 1941, 38, 10-11-123).

TESI (A.). — Interprétation étio-pathogénique des maladies rhumatismales ; rôle des strepcocoques hémolytiques du groupe A et du bacille de Koch. *Reumatisma*, 4, n° 6, nov.-déc. 1952).

TZANCK et J. DAUSSET. — Immuno-hématologie et clinique : les maladies d'auto-agression. *Sem. des Hôp.*, 10-3-52, n° 19, pp. 793-801.

VOISIN (G.). — Auto-sensibilisation et maladies auto-entretenues. *Paris Médical*, 1951, n° 2, mars-avril.

VOISIN (G). — Critique et place de l'auto-sensibilisation dans la pathologie du névraxe, les maladies démyélinisantes. *Presse Méd.*, n° 16, 3 mars 1953.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 15

CHAPITRE PREMIER .....

Production expérimentale d'auto-anticorps pour le cœur, le muscle et le tissu conjonctif - Travaux de Cavelti 19

CHAPITRE II .....

Production expérimentale d'iso-anticorps pour le cœur - Travaux personnels 25

1° - Etude des modifications de l'équilibre protéique par électrophorèse sur papier 29

2° - Etude des modifications sérologiques par la méthode de floculation des particules de collodion 33

CHAPITRE III .....

Localisation des globulines anticorps 37

CHAPITRE IV .....

Constatations histo-pathologiques 55

CONCLUSIONS 59

BIBLIOGRAPHIE 63